Extração e determinação de atividade de peroxidase do *nabo*, em diferentes estágios de crescimento e analisar a influência dos íon Ca^{2+} no crescimento *in vitro*.

Elaine de Lima de Jesus¹; Heiddy Márquez Alvarez².

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmacia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: elnylima@hotmail.com

2. Orientador, Departamento Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marquezheiddy@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: atividade peroxidase; nabo; íons bivalentes de Cálcio.

INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores de origem animal, vegetal ou microbiana, descobertas no século XVIII, em estudos sobre digestão de alimentos e os trabalhos de purificação iniciaram após 1920 (FATIBELLO-FILHO et al., 2002).

As enzimas, dentre as principais a peroxidase, apresenta um potencial pela reação com uma gama de compostos orgânicos. A degradação e transformação por catalise acontece por precipitação e/ou ruptura do anel aromático, e toda essa produção e processos demandam custo elevado com baixo rendimento. A redução do custo de produção dessas enzimas pode ser obtida pela utilização de vegetais contendo alta atividade enzimática, e que podem ser aplicados diretamente com a mesma eficiência que a enzima purificada, comparado aos convencionais, já que apresenta limitações devido ao baixo rendimento e o alto custo de produção destes biocatalisadores. (FATIBELLO-FILHO et al., 2002).

O território nacional contém uma vasta variedade de frutas e vegetais, na sua maioria, de baixo custo, sendo uma fonte inesgotável de enzimas com potencial de utilizações *in natura* ou como extrato bruto, e de simples extração, com vários procedimentos podem envolver diferentes etapas de purificação. Existe interesse na elaboração de pesquisas por estas enzimas pelo motivo de suas aplicações, como por exemplo, a construção de biossensores, industrial, análises bioquímicas, entre outras. (ZERAÍK et al. 2008)

O nabo consiste em um tubérculo de melhores adaptabilidade, podendo ser cultivado em uma ampla faixa de variação climática e de solo, com uma possível capacidade de desenvolvimento, quem pode ser corrigida por acréscimo de nutrientes, além de ser uma fonte de produção peroxidase (OLIVEIRA, 2009). Assim, o presente trabalho propõe a análise da atividade peroxidase deste tubérculo, tendo em consideração a influência de diferentes estágios de colheitas e variação de utilização dos íons bivalentes de Cálcio (CA).

MATERIAL E MÉTODOS

Germinação das sementes:

Para a germinação, foi utilizado o meio Muraschige e Skoog (MS), tendo como composição: nitrato de amônio 82,5 g/L, que compõe a solução A (20 mL da solução para 1L de meio), nitrato de potássio 95 g/L, que compõe a solução B (20mL da solução para 1L de meio), fosfato de potássio 34g/L, ácido bórico 1,24g/L, molibdato de sódio 0,05g/L , cloreto de cobalto 0,005g/L, iodeto de potássio 0,166g/L que compõe a solução C (5 mL da solução para 1L de meio), cloreto de cálcio 8,8g/L compõe a solução D (50 mL para 1L de meio), sulfato de magnésio 74g/L, sulfato de manganês 4,46g/L, sulfato de zinco 1,72g/L, sulfato de cobre 0,005g/L compõe a solução E(5 mL

da solução para 1L de meio) , sulfato ferro 5,57g/L, EDTA de sódio 7,45g/L compõe a solução F (5 mL para 1L de meio), tiamina 0,1g/L, piridoxina HCl 0,05g/L, ácido nicotínico 0,05g/L compõe a solução G(10mL para 1L de meio), mio-inositol (2g/L) solução H(50mL para 1L de meio), glicina 0,08g/L solução I (25 mL da solução pra 1L de meio), no meio também é acrescentado sacarose 30g/L e Agar 7g/L . Além do acréscimo de variadas concentrações de Cálcio.

Preparação do meio MS/2:

Foram utilizados 1L de água destilada, tendo a homogeneização com sacarose e ágar através do auxílio do agitador magnético e posteriormente sendo acrescentado os nutrientes citados anteriormente. Após o ajuste de pH para 5,7, o meio foi aquecido em forno de micro-ondas para a fervura e distribuído igualmente em frascos de vidro, tampado com papel laminado e papel filme respectivamente. Para esterilizado na autoclave com o tempo de 30 minutos.

Desinfestação das sementes:

Por um minuto, as sementes sofreram imersão em etanol a 70%, e depois por 15 minutos no hipoclorito 2% e por fim, foram lavadas em água destilada.

Inoculação das sementes:

Inicialmente houve a esterilização dos frascos utilizando etanol a 70%. O processo de inoculação foi realizado na cabine de fluxo contínuo sendo as pinças utilizadas para o procedimento, flambadas a cada semente inoculada. Depois da inoculação, os frascos foram vedados com papel filme e levados para a sala de crescimento, com condições de temperatura e luminosidade propícia para o desenvolvimento do nabo, para a coleta após 15 dias, 30 dias e 45 dias e armazenado sob refrigeração.

Extração da enzima e análise da atividade peroxidásica:

Para a obtenção do extrato bruto, primeiramente o tubérculo coletado foi lavado, separado e pesados em porções de 0,1000g, macerada no almofariz junto a 10 mL de tampão fosfato (0,05 mol/L), com pH 6,5 e filtrado.

A atividade enzimática da peroxidase de rabanete (RAP) foi determinada por método colorimétrico, baseado na mudança de absorvância a 470 nm devido à formação do produto de oxidação do guaiacol, o tetraguaiacol. HIRATA *et al.*, (1998).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Na figura 1 se apresentam os experimentos de germinação realizados no horto florestal.

Figura 1. Germinação das sementes do nabo

As sementes do nabo *Raphanussativus* var. *acanthioformis* começaram a germinar no quinto dia no meio de cultura Muraschige e Skoog (MS)

As sementes de nabo cultivadas em meio MS, com apenas influência de sais e vitaminas essenciais para o crescimento do nabo, apresentou uma atividade peroxidásica considerável na amostra colhida no décimo quinto dia com atividade de 0,38 U/mg em comparação aos demais dias. As amostras colhidas no trigésimo dia apresentaram o menor grau de atividade da enzima peroxidase de 0,15 U/mg.

Na figura 1, se apresentam os resultados obtidos da atividade enzimática da peroxidase no processo de germinação das sementes do nabo em diferentes tempos de coleta utilizando o meio de cultura MS.

Figura 2: Atividade de enzima peroxidase em diferentes dias em meio MS.

Na figura 2 podemos observar que a maior atividade enzimática foi obtida no início da germinação, aos quinze dias.

As sementes cultivadas em meio MS adicionando solução de cloreto de cálcio (Ca^{2+}) com concentração de $10\mu\text{M}$, figura 3, também apresentaram maior atividade de 0,30 U/mg no decimo quinto dia, e menor atividade de 0,26 U/mg no quadragésimo quinto dia comprovando que para melhor obtenção da enzima peroxidase é após 15 dias da sua germinação.

Figura 3: Atividade da enzima peroxidase em diferentes dias de germinação em meio MS sob influência de solução de cloreto de cálcio, $10\mu\text{M}$.

Ao comparar a atividade da enzima peroxidásica no processo de germinação no meio MS em relação ao meio MS com acréscimo de solução de cloreto de cálcio de concentração $10\mu\text{M}$, figura 3, podemos observar que somente tem influência do íon Ca^{2+} a partir do trigésimo dia. A utilização do cloreto de cálcio no meio de crescimento MS provocou uma redução da atividade enzimática das sementes de nabo, sendo perceptível que sua adição ao meio não é favorável.

Figura 4: Comparação atividade de enzima peroxidase em diferentes dias em meio M/S sob influência de Cálcio 10µM.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo os experimentos realizados, o melhor dia de colheita da semente germinada é no decimo quinto dia.

O acréscimo de íons cálcio na concentração de 10µM ao meio de cultura não aumenta a atividade enzimática.

REFERÊNCIAS

- HIRATA, T. et al..1998 *E poxidation ofstyrenes with the peroxidase from the culture cells of Nicotianatabacum*, *Tetrahedron*, 54, p. 15993 16003.
- OLIVEIRA, A. S. 2009. *Características agronômicas e qualidade de sementes de nabo forrageiro em função da densidade de semeadura e do espaçamento*. Minas Gerais, 5p.
- ZERAIK, A. E. et al.. 2008. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. vol 31, n 4, *Quim. Nova*.
- FELIBERTO-FILHO, O. et al. 2002. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. vol 25, n. 3, *Quimica Nova*.